УДК 619:616.983.636

Ермакова И.А., Карташов С.Н., Корниенко Г.Г., Василенко В.Н., Ключников А.Г.
(ГНУ СКЗНИВИ Россельхозакадемии)

РОЛЬ ESCHERICHIA COLI В РАЗВИТИИ ПИОМЕТРЫ У СОБАК

Ключевые слова: собаки, Escherichia coli, пиометра, эндометрит, диагностика.

ВВЕДЕНИЕ

Пиометра, или гнойный эндометрит, у собак - болезнь взрослых животных, характеризующаяся воспалением слизистой матки оболочки с накоплением в ее полости гноя. Пиометра признана одной из главных причин заболевания и смерти этих животных.

Заболевание, как правило, развивается в лютеальную фазу полового цикла. Как правило, развитию заболевания предшествует гипреплазия эндометрия, связанная с повышенным содержанием прогестерона. Большинство авторов связывают возникновение пиометры с гормональными изменениями при одновременном внутриматочном инфицировании [5,6].

Бактериальная инфекция - второе условие, необходимое для возникновения пиометры. При развитии кистозной гиперплазии эндометрия, матка не способно к самостерилизации после эструса, и бактерии легко выживают в кистозной жидкости измененного эндометрия [6].

Наиболее часто встречающейся бактерией, заселяющей полость матки в период эструса является Escherichia coli [1]. Некоторые штаммы E. coli является патогенным для человека, вызывая тяжелые желудочно-кишечные расстройства и экстра-кишечные инфекции, например, инфекции мочевыделительного тракта, либо пневмонию. У детей риск заболевания возрастает [3].

В связи с этим в собственном исследовании мы решали следующие задачи: оценить микробиологические аспекты пиометры у собак; провести идентификацию генов ответственных за факторы патогенности E.coli; определить возможные риски для здоровья человека, контактирующего с больным животным.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В ветеринарных клиниках «Центр» г. Ростов-на-Дону, «Вита» г. Шахты и г. Таганрог Ростовской области были исследованы 100 собак с диагностированной пиометрой. Возраст исследованных животных колебался от 2 до 16 лет. В анамнезе: 11% собак применялись препараты прогестерона с целью контроля рождаемости, 64% сук ни разу не щенились, 21 % щенились один раз, и 14 % щенились неоднократно.

Микробиологические исследования. Стерильным способом отбирали по 5 мл внутриматочной жидкости из каждого рога матки во время овариогистерэктомии. Часть полученных образцов культивировали в аэробных условиях на кровяном агаре при 37ºC в течение 24-96 ч., часть - в аэробных условиях на среде Китта-Тароцци при 37ºC в течение 24 ч.

Исследование факторов патогенности изолированных штаммов E. coli. Исследование факторов патогенности выделенных штаммов E. coli проводили методом выявления соответствующих генов методом ПЦР.

Для этого использовали наборы праймеров к сиквенсам соответствующих генов: ассоциированного с пиелонефритом (pap), гемолизина (hly), аэробактина (iuc), цитотоксин-некротизирующего фактора(cnf1), S фимбрия (sfa), афимбиральный адгезин I (afa), теплолабильный (LT) и теплостабильные факторы (STa и STb), энтеротоксин и веротоксин (VT). Размеры ампликонов и источники структуры указаны в таблице 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микробиологические исследования

Из 200 образцов внутриматочной жидкости в 197 образцах (98,5 %) получен рост микроорганизмов при посеве на питательные среды. Три стерильных образца были получены от сук из одного рога матки, тогда как в другом роге матки отмечался рост бактерий.

При исследовании были изолированы следующие бактерии: E.coli - из 74,1% образцов внутриматочной жидкости, Klebsiella pneumoniae subsp.pneumoniae - 3 %, Citrobacter diversus -3 %, Pseudomonas

aeruginosa - 2 %, Staphylococcus kloosii - 2 %, Salmonella spp. - 2 %, Proteus mirabilis - 2 %, Streptococcus sp. - 1 %, Morganella morgani - 1 %, Klebsiella pneumoniae subsp. azanae - 1 %, Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans - 1 %, Staphylococcus intermedius - 1 %, Staphylococcus epidermidis - 1 %, Streptococcus canis - 1 %, Corynebacterium jeikeium - 1 %.

Поражения матки E. coli возникали и как моноинфекция, и в ассоциации с другими бактериями. Ассоциации возбудителей отмечались в 2,5 % образцов. Это были следующие ассоциации: E.coli и Staphylococcus kloosii - получены из внутриматочной жидкости двух рогов матки; E.coli и Enterococcus faecium - получены из внутриматочной жидкости двух рогов матки, E. coli и Streptococcus spp - получены из внутриматочной жидкости одного рога матки и E. coli от второго рога матки этого же животного. Частота изоляции E. coli (76,6 %) были статистически выше (P <0,05) при сравнении с другими микроорганизмами.

Таблица 1

Праймеры использованные для определения различных генов, размер ампликона

Ген	праймер	олигонуклеотидная пара (5´→3´)	размер	источник
LT	LTA-1 LTA-2	GGCGACAGATTATACCGTGC CCGAATTCTGTTATATATGTC	696	Schultsz et al., 1994
STa	STI-1 STI-2	TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG CTTGACTCTTCAAAAGAGAAAATTAC	147	Olsvik et al., 1993
STb	STb-1 STb-2	ATCGCATTTCTTCTTGCATC GGGCGCCAAAGCATGCTCC	172	Blanco et al., 1997
VT1	VT1-A VT1-B	GAAGAGTCCGTGGGATTACG AGCGATGCAGCTATTAATAA	130	Pollard et al., 1990
VT2	VT2-3 VT2-5	CCGTCAGGACTGTCTGAAAC GAGTCTGACAGGCAACTGTC	726	Woodward et al., 1992
pap	pap-1 pap-2	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	336	Yamamoto et al., 1995
hly	hly-1 hly-2	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	1177	Yamamoto et al. 1995
iuc	iuc-1 iuc-2	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG	602	Yamamoto et al.,1995
cnf	cnf1 cnf2	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG CATTCAGAGTCCTGCCCTCATTATT	498	Yamamoto et al., 1995
sfa	sfa-1 sfa-2	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410	Yamamoto et al., 1995
afa	afa-1 afa-2	GCTGGGCAGCAAACTGATAACCTC CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	750	Yamamoto et al., 1995

Исследование факторов патогенности полученных штаммов E. coli

Из 151 изолированных штаммов E.coli, - 79,5 % оказались положительными на ген sfa, 57,6 % были положительны на ген pap, 56,9 % - на ген cnf, 34,4 % на ген hly, 33,8 % - на ген iuc и -3,3 % - на ген afa. Ни один из образцов не был положительным на гены LT1, LT2, Sta, STb, VT1 и VT2. 2,0 % из всех изолятов не были положительны ни на один из учитываемых факторов патогенности.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Fransson и др. [4] изолировали E.coli у 90% сук с пиометрой. В нашем исследовании E.coli была выделена из 76,6 % образцов внутриматочной жидкости полученной от сук с пиометрой. Количество образцов, из которых была выделена E.coli,

статистически больше, чем количество образцов, из которых были выделены другие агенты (P <0,05).

Уропатогенные E. coli (UPEC) вызывают поражения мочевых путей и почек у человека и других видов животных. Бактерии перемещаются из желудочно-кишечного трактат в мочевые пути. Большинство инфекций мочевого тракта начинается с колонизации штаммами E. coli, способными к размножению в нем [12].

P pili является самым важным адгезином в штаммах E. coli, вызывающих поражение почек. Ген ответственный за функции этого адгезина называют pap (pyelonephriti associated pili) [12]. Johnson и др. [8] проанализировали 63 образца фекалий собак и в 30 % выделили E. coli, из них у 56 % штаммов наблюдался ген pap. На основании этих данных они заключили, что ExPEC (extra-intestinal pathogenic E. coli) постоянно присутствует в собачьих фекалиях и может быть источником ExPEC для людей. В нашем исследовании 57,6 % изолированных E.coli были положительными на ген pap. Таким образом результаты, полученные нами, совпадают с результатами авторов при исследовании фекалий здоровых собак. Это позволяет сделать вывод, что E. coli, выделенные из образцов внутриматочной жидкости от собак с пиометрой, попали в матку из кишечника той же самой собаки.

S fimbria S (sfa) является также важным ассоциированным с болезнями почек у людей и животных адгезином [12]. В нашем исследовании 79,5 % выделенных штаммов E. coli были положительными на sfa, что, по-видимому, указывает на то, что данный адгезин играет значимую роль в колонизации матки больных собак.

У уропатогеных штаммов E. coli, также находят еще один адгезин - afimbrial (afaI и afaIII) [12]. В нашем исследовании только в 3,3 % образцов была изолирована E. coli положительная на ген afa. По всей видимости, данный адгезин не имеет большого значения в развитии заболевания.

Некоторые уропатогенные E.coli производят экзотоксин, первоначально названный гемолизин (ответственный за его синтез ген имеет название hly), ген), поскольку был способен разрушать эритроциты и другие клетки с развитием воспалительной реакции [10, 12]. Многочисленные исследования доказали способность штаммов Escherichia coli, выделять гемолизин, вызывающий экстра-кишечные инфекции у людей [7]. У многих штаммов E. coli изолированных от собак и кошек с инфекциями мочевых путей имеется hly [14]. Low et al. [9] сравнивая гены pap и hly штаммов E. coli выделенных от собак и людей с инфекциями мочеполового тракта показали, что все изолированные штаммы имели идентичную структуру этих генов. Соответственно, некоторые штаммы E.coli способны инфицировать как собак, так и людей. В нашем исследовании 34,4 % образцов E. coli, изолированных от собак больных пиометрой, были положительными на ген hly. Этот показатель ниже, чем при выделении E. coli от людей с урологическими заболеваниями, что показывает меньшую роль данного фактора в развитии пиометры, чем в патологии уринального тракта.

Цитостатический некротизирующий фактор (cnf) рассматривается как важный фактор патогенности данного микроорганизма Pohl et al. [11], Wray и Woodward [15] and Beutin [1]. На сегодняшний день описаны два типа цитостатического некротизирующего факторы, cnf1 и cnf2. В нашем исследовании cnf также был обнаружен у большого количества штаммов (56,9 %).

Известны и другие факторы болезнетворности уропатогенных штаммов E. coli, такие, например, как способность захватывать железо (ответственен ген iuc) [2, 12]. В нашем исследовании 33,8 % штаммов E. coli из внутриматочного содержимого были положительны на ген iuc. Похожие данные наблюдали De Lorenzo и Martinez в фекалиях здоровых собак [2]. Это также доказывает, что источником E. coli, вызывающей пиометру у собак является собственная микрофлора кишечника.

Von Sydow и др. в 89,21 % выделили из кала здоровых собак E.coli. У 76 % выделенных штаммов отмечались различные факторы патогенности. Наиболее частыми из них были: iuc (48%), sfa (40 %) и pap (24 %). 57,14 % выделенных штаммов были положительны больше чем одному фактор ядовитости [13].

В нашем исследовании 98,0 % выделенных штаммов Escherichia coli имели факторы патогенности E. coli (P <0,05), наиболее часто встречались: sfa (79,5 %), pap (57,6 %) и cnf (56,9 %); 80,4 % выделенных штаммов были положительны больше чем по одному фактору патогенности. Это предполагает, что отмеченные факторы имеют большее значение в колонизации матки у собак при развитии пиометры.

Таким образом, факторы патогенности были идентифицированы у 98,0 % штаммов, выделенных от собак больных пио-

метрой, что говорит о высокой потенциальной патогенности штаммов E. coli, вызывающих пиометру у собак, а также характеризует больных животных, как важный источник в инфицировании человека.

Резюме: На сегодняшний день пиометра, или гнойный эндометрит, по причине смертности у сук стоит на втором месте после онкологических заболеваний.

Целью данного исследования было выяснить факторы патогенности Escherichia coli, выделенной из матки у собак больных пиометрой и определить возможные риски для человека, связанные с эшерихиозом.

В процессе исследования были выявлены факторы патогенности различных штаммов E. coli, выделенных от 100 собак с пиометрой.

Исследовали внутриматочное содержимое собак, больных пиометрой. Штаммы E. coli идентифицировали посредством ПЦР-диагностики. Кроме того, подсчитывали количество колониеобразующих единиц, а также были сделаны тесты на антибактериальную чувствительность изолированных штаммов E. coli.

Из всех выделенных микроорганизмов E. coli составила 76,6 %. При этом 120 штаммов E. coli (79,5 %) были положительны на ген sfa, 86 штаммов (56,9 %) были положительны на ген cnf, 87 штаммов (57,6 %) были положительны на ген pap, 52 штаммов (34, 4 %) были положительны для hly, 51 штаммов (33,8 %) были положительны для iuc и 5 штаммов (3.3 %) были положительны для afa генов.

Исследование также показало наибольшую чувствительность выделенных штаммов E. coli к норфлоксацину, полимиксину B, сульфазотрину, хлоранфениколу и энрофлоксацину.

Факторы патогенности E. coli были идентифицированы в 98,0 % изученных штаммов, демонстрируя высокую частоту потенциально патогенных микроорганизмов.

SUMMARY

E. coli was the most widespread a microorganism allocated from dogs with pyometra (76,6 %). 120 strains E. coli (79,5 %) were positive on a gene sfa, 86 (56,9 %) were positive on a gene cnf, 87 (57,6 %) were positive on a gene pap, 52 (34, 4 %) were positive for hly, 51 (33,8 %) were positive for iuc and 5 (3,3 %) were positive for afa genes. One observed more sensitivity of E. coli to norfloxacin, polimixin B, sulphazotrin, chloranfenicol and enrofloxacin. In 42% of the samples of uterine walls where microorganisms were isolated, the sizes of the areas of the inflammatory responses corresponded to 39-56%. Factors of pathogenicity E. Coli have been identified in 98,0 % studied strains, showing high frequency potentially pathogenic E. coli. Probably, that the dogs, living glad with the man not one thousand years are the important factor in transfer pathogenic E. coli to other animals and the man.

Keywords: dogs, Escherichia coli, pyometra, endometritis, diagnostics.

Литература

1. Beutin, L. (1999): Escherichia coli as a pathogen in dogs and cats. Vet. Res., 30, 285-298.
2. De Lorenzo, V.; Martinez, J.L. (1988). Aerobactin production as a virulence factor: a reavaluation. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 7, 621-629.
3. Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M. (1996). Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: Franco B.D.G.M., Landgraf, M. (eds.). Microbiologia dos Alimentos. Atheneu, São Paulo, pp. 33-81.
4. Fransson, B.; Lagerstedt, A.S.; Hellmen, E.; Jonsson, P. (1997). Bacteriological findings, blood chemistry profile and plasma endotoxin levels in bitches with pyometra or other uterine disease. J. Vet. Med., 44, 417-426.
5. Grooters, A.M. (1994). Diseases of the ovaries and uterus. In: Birchard, S.J., Sherding, R.G. (eds.), Saunders Manual of Small Animal Practice, 3rd. edn. W.B. Saunders Company, Ohio, pp. 613-632.
6. Hidalgo, C.G.; Cohen, A.S.; Méndez, J.V. (1986). Reproducción de Animales Domésticos. Editorial Limusa, Balderas.
7. Hughes, C.; Hacker, J.; Roberts, A.; Goebel, W. (1983). Hemolysin production as a virulence marker in symptomatic and asymptomatic urinary infections caused by Escherichia coli. Infec. Immun., 39, 546-551.
8. Johnson, J.R.; Stell, A.L.; Delavari, P. (2001). Canine feces as a reservoir of extraintestinal pathogenic Escherichia coli. Infec. Immun., 69, 1306-13
9. Low, D.A.; Braaten, B.A.; Ling, G.V.; Johnson, D.L.; Ruby, A.L. (1988). Isolation and comparison of Escherichia coli strains from canine and human patients with urinary tract infections. Infec. Immun., 56, 2601-2609.
10. Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.C.; Yolken, R.H. (1999). Manual of Clinical Microbiology, 7th edn. American Society for Microbiology, Washington.
11. Pohl, P.; Oswald, E.; Van Muylem, K. (1993). Escherichia coli producing CNF1 and CNF2 cytotoxins in animals with different disorders. Vet. Res., 24, 305-311.
12. Saylers, A.A.; Whitt, D.D. (2002). Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach. ASM Press, Washington.
13. Von Sydow, A.C.M.D.G.; Coogan, J.A.; Moreno, A.M.; Melville, P.A.; Benites, N.R. (2006): Ocorrência de fatores de virulência em estirpes de Escherichia coli isoladas de fezes de cães errantes. Arq. Inst. Biol., 73, 401-407.
14. Wilson, R.A.; Keefe, T.J.; Davis, M.A.; Browing, M.T.; Ondrusek, K. (1988). Strains of Escherichia coli associated with urogenital disease in dogs and cats. Am. J. Vet. Res., 49, 743-746.
15. Wray, C.; Woodward, M.J. (1997). Escherichia coli infections in farm animals. In: Sussman, M. (ed.). Escherichia coli: Mechanisms of Virulence. Cambridge

University Press, United Kingdom, p. 49-84.
16. Карташова Е.В., Шафикова А.В., Ермакова И.А. Некоторые аспекты возникновения хронических эндометритов у собак. – Краснодар. – Ветеринария Кубани, № 2, 2009. – с. 21-23.

Контактная информации об авторах для переписки
Ермакова И.А., Карташов С.Н., Корниенко Г.Г., Василенко В.Н., Ключников А.Г.
ГНУ СКЗНИВИ Россельхозакадемии

УДК 619:614.2(571.54)

Очирова Л.А., Ринчинова О.Н., Будаева А.Б.
(Управление ветеринарии Республики Бурятия, ФГБОУ ВПО «Иркутская ГСХА», Кяхтинский филиал ветеринарии «БРСББЖ»)

РЕГУЛИРОВАНИЕ ГОСУДАРСТВЕННЫХ ФУНКЦИЙ ПО ОСУЩЕСТВЛЕНИЮ ГОСУДАРСТВЕННОГО ВЕТЕРИНАРНОГО НАДЗОРА В РЕСПУБЛИКЕ БУРЯТИЯ

Ключевые слова: административный регламент, государственный ветеринарный надзор.

В целях совершенствования деятельности органов исполнительной власти субъектов Российской Федерации в области ветеринарии, более четкого исполнения требований федеральных законов, регулирующих их государственные функции рекомендуется разработать и использовать в своей практической деятельности соответствующие административные регламенты [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9]. Управлением ветеринарии Республики Бурятия разработан административный регламент по осуществлению регионального государственного ветеринарного надзора в соответствии сФедеральным Законом № 294-ФЗ «О защите прав юридических лиц и индивидуальных предпринимателей при осуществлении государственного контроля (надзора) и муниципального контроля».

Материал и методы исследования.

При разработке административного регламента Управлением ветеринарии Республики Бурятия по осуществлению государственных функций руководствовались Конституцией РФ, Гражданским кодексом РФ, Законом РФ «О ветеринарии», законом РБ «Об обеспечении эпизоотического и ветеринарно-санитарного благополучия Республики Бурятия», ФЗ «О защите прав юридических лиц и индивидуальных предпринимателей при осуществлении государственного контроля (надзора) и муниципального надзора», постановлением Правительства РФ «Об утверждении Положения о государственном ветеринарном надзоре в Российской Федерации», нормативными правовыми актами МСХ РФ в области ветеринарии.

Результаты исследований.

В административном регламенте Республики Бурятия по осуществлению регионального государственного ветеринарного надзора в соответствии Федерального Закона № 294-ФЗ по исполнению государственной функции по контролю деятельности государственных ветеринарных инспекторов предусмотрены:

- взаимодействие функций с республиканским агентством гражданской обороны и чрезвычайных ситуаций, республиканской службой по потребительскому рынку и лицензирования, государственным учреждением природопользования и охрана окружающей среды Республики Бурятия, республиканской службой по охране , контролю и регулированию использова-